人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

accura-expRACE KIT

[ækjurə-ikspré(i)s]

エルプレイン研究所

El Plain Institute

Revolutionary
Tools for
Continual
Discovery

Code No.	EPI001
Lot No.	0001
Storage	–20℃

本製品は研究目的の使用のために販売しています。医薬品・診断用医薬品・食品・化粧品等としては使用できません。人体には決して使用しないよう注意をお願いします。

目次

I. キット構成品 3
A. First-Strand cDNA 合成 3
B. Second-Strand cDNA 合成 3
C. その他の試薬 3
D. RACE PCR 3
II. キット構成品以外に必要な材料 4
III. First-Strand cDNA 合成 4
IV. Second-Strand cDNA 合成 5
V. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 6
A. RACE PCR 7
B. クローニングと DNA 塩基配列の決定 8
C. コントロール m*Tfrc* 5'および 3' RACE プライマーの用い方 8
D. コントロールプライマーによる RACE PCR と RT-PCR の実施例 9
E. RACE によってより長い cDNA を得たい場合 10
VI. 問題の発生とその解決法 10
A. ds cDNA 合成 10
B. RACE 11
C. 希少な転写産物の RACE 11
D. Genomic DNA の偶発的な増幅 11
VII. シングルプライマーRACE 法の重要な特性と応用 11
VIII. Conclusion 推断 12
IX. 参考文献 12

取扱説明書

本キットには 5 回の cDNA 合成と RACE PCR に必要な試薬が含まれています。熱安定性 DNA ポリメラーゼは含まれていません。poly(A)$^+$ RNA を精製することが必要です*。

I. キット構成品

A. First-Strand cDNA 合成

1. 100 µl　5X RTase (Reverse Transcriptase) Buffer
   250 mM Tris-HCl, pH 8.3
   375 mM KCl
   15 mM $MgCl_2$
2. 10 µl　Oligo(dT)$_{20}$ Primer (10 µM)
3. 5.5 µl　M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (改良型) (50 U/µl)
   起源：組換え体大腸菌で発現・精製

B. Second-Strand cDNA 合成

4. 200 µl　5X Second-Strand Synthesis Buffer
   100 mM Tris-HCl, pH 7.5
   500 mM KCl
   25 mM $MgCl_2$
   50 mM $(NH4)_2SO_4$ (Ammonium Sulfate)
   5 mM Dithiothreitol (DTT)
   0.25 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)
   0.75 mM β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β-NAD)
5. 5.5 µl　*E. coli* RNase H (1 U/µl)　起源：組換え体大腸菌で発現・精製
6. 5.5 µl　*E. coli* DNA Ligase (5 U/µl)　起源：組換え体大腸菌で発現・精製
7. 11 µl　*E. coli* DNA Polymerase I (12 U/µl)　起源：組換え体大腸菌で発現・精製
8. 300 µl　EDTA (0.5 M EDTA, pH 8.0)

C. その他の試薬

9. 40 µl　10 mM dNTP Mix (10 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
10. 500 µl　7.5 M Ammonium Acetate
11. 1.7 ml　滅菌水 Distilled Water, Deionized, Sterile
12. 1.6 ml　TE, pH 8.0
    10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
    1 mM EDTA (pH 8.0)

D. RACE PCR

Control 5' and 3' RACE Primers

13. 200 µl　Mouse Transferrin Receptor (*Tfrc*) 5' RACE Primer (10 pmol/µl): 5'-TTCTCAGGTGGCAGCTTTGAACT-3' (Tm 62.58℃)
14. 200 µl　Mouse Transferrin Receptor (*Tfrc*) 3' RACE Primer (10 pmol/µl): 5'-CGTGGAGACTACTTCCGTGCTAC-3' (Tm 62.55℃)
    (Full-length cDNA ~4.9 kb)

註）各キット構成品は、ほぼ実験で使用する順序に合わせてケースの手前・左から右へ、次の列・左から右へと並んでいます。

* BioMag® mRNA精製キット(Polysciences)、NucleoTrap® mRNA (MACHEREY-NAGEL)、FastTrack® 2.0 mRNA Isolation Kit (Life Technologies)、Absolutely mRNA Purification Kit (Agilent Technologies)等を使用してpoly(A)$^+$ RNAの精製を行なうことができます。

II. キット構成品以外に必要な材料

1. 熱安定性 DNA Polymerase (PrimeSTAR (TaKaRa), KOD (TOYOBO), Pfu (Thermo Fisher Scientific), Phusion (New England Biolabs), etc.)
2. Phenol (TE, pH 8.0 飽和)
3. 99.5% Ethanol
4. 75% Ethanol
5. TE, pH 8.0

III. First-Strand cDNA 合成

本方法は、逆転写の効率を上げるために開発された改良型逆転写酵素 M-MLV RTase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)を使用した cDNA 合成法です。この酵素は伸長性が非常に向上しており、長い First-Strand cDNA を合成することができます。また GC リッチなど高次構造を形成しやすい RNA 領域でも、通常の逆転写反応温度 42℃で効率良く First-Strand cDNA を合成することができます。本方法は完全長 cDNA の比率が高い cDNA ライブラリーの作製に非常に適しています。

First-Strand cDNA 合成反応溶液の組成

5X RTase Buffer	2 μl
10 mM dNTP	1 μl
10 μM Oligo(dT)$_{20}$	1 μl
poly(A)$^+$ RNA	1 μg (1~5 μl)
M-MLV RTase (改良型) (50 U/μl)	1 μl
滅菌水	(4~0) μl
Total volume	10 μl

1. poly(A)$^+$ RNA、Oligo(dT)および滅菌水を氷中で融かす。0.5 ml の滅菌済みチューブを氷中に立てる。また 5X RTase Buffer、10 mM dNTP Mix も氷中で融かす。
2. 1 μg の poly(A)$^+$ RNA (1~5 μl)と Oligo(dT) Primer 1 μl を 0.5 ml の滅菌済みチューブに加える。
3. 滅菌水を加えて 6 μl にする。
4. 数回のピペッティングによって良く混合した後、4℃に設定した微量高速遠心機で軽く遠心する。
5. 70℃で 3 分間インキュベートする。
6. 氷中で 3 分間冷やす。
7. 4℃に設定した微量高速遠心機で軽く遠心して溶液をチューブの底に落とす。
8. 次のものを反応チューブに加える。

5X RTase Buffer	2 μl
10 mM dNTP	1 μl
M-MLV RTase (改良型) (50 U/μl)	1 μl
Total volume	10 μl

9. ピペッティングによって穏やかによく混合する。
10. 4℃に設定した微量高速遠心機で軽く遠心する。
11. 42℃で 1 時間インキュベートする。(インキュベーター(恒温器)が好ましいが、ヒートブロックに蒸留水を張り蓋をする等でも良い。)
12. 反応チューブを氷中に 2~3 分間立てて反応を止める。
13. 同じ反応チューブで、続けて Second-Strand cDNA 合成に進む。

IV. Second-Strand cDNA 合成

Second-Strand cDNA 合成は同じ反応チューブに下記の試薬を加えて行います。RNaseH、*E. coli* DNA Polymerase I および *E. coli* DNA Ligase によって RNA-DNA ハイブリッドの RNA が分解されて Second-Strand cDNA が合成されます(1, 2)。本キットによる RACE 法では、合成した Double-Stranded (ds) cDNA にアダプターやアンカー等をライゲーションする必要がないので、T4 DNA Polymerase を用いて ds cDNA の末端を平滑端にする必要はありません。ds cDNA 合成が終わるとすぐに RACE 実験に移行することができます。

1. 5X Second-Strand Buffer、dNTP Mix、滅菌水を氷中で融かす。
2. 次のものを First-Strand cDNA 反応チューブに加える。

(First-Strand Mix	10 μl)
滅菌水	48.4 μl
5X Second-Strand Buffer	16 μl
dNTP Mix (10 mM)	1.6 μl

Vortex で短時間軽く混合し軽く遠心した後、酵素を加える。

E. coli RNase H 1U	1 μl
E. coli DNA Ligase 5U	1 μl
E. coli DNA Polymerase I 24U	2 μl
Total volume	80 μl

3. 穏やかなピペッティングによってよく混合する。
4. 4℃に設定した微量高速遠心機で軽く遠心して反応液をチューブの底に落とす。
5. 16℃で 1.5 時間インキュベートする。
6. 1.6 μl の 0.5 M EDTA, pH 8.0 を加えて反応を停止する。
7. 80 μl のフェノール(TE, pH 8.0 飽和)を加えて良く Vortex する。
8. 微量高速遠心機の最大速度(~15,000 rpm)で、室温で 10 分間遠心する。
9. 水層を 0.5ml の滅菌チューブに回収する。
10. 7.5 M Ammonium Acetate (酢酸アンモニウム)を 29 μl 加える。(最終濃度 2 M)
11. 2.5 倍量の 99.5%エタノール(272.5 μl)を加えて、チューブを転倒して良く混合する。
12. チューブを–20℃で約 1 時間冷やす。
13. 微量高速遠心機の最大速度(~15,000 rpm)で、4℃で 20 分間遠心する。
14. 上清を、ピペットマンを用いて慎重に取り除く。
15. –20℃で冷やした 75%エタノール 400 μl を静かに加える。
16. 微量高速遠心機の最大速度(~15,000 rpm)で、4℃で 5 分間遠心する。
17. 上清を、ピペットマンを用いて慎重に取り除く。
18. ペレット*を乾燥する。5~10 分間静置してエタノールを蒸発させる。

*ペレットがほとんど見えない場合もあります。

19. 10 μl の TE, pH 8.0 を加えて溶解する。
20. 1 μl の ds cDNA を最終濃度が 0.2~0.4 μg/ml になるように 250~500 μl の TE, pH 8.0 で希釈する。

cDNA 合成の確認

[α-^{32}P]dCTP ラベルによる cDNA 合成のモニタリングの代わりに、最終産物 (19. 10 μl TE, pH 8.0 溶液)の一部(例: 1 μl)をアガロースゲル電気泳動して ds cDNA 合成の成否を確認することができます(図 1)。

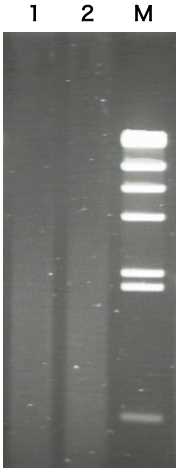


図 1. ds cDNA 合成の結果

ds cDNA 合成はマウス精巣 poly(A)$^+$ RNA を用いて行なった。1 μl cDNA を 1 %アガロースゲル電気泳動した結果を示している。レーン 1、2: それぞれ別のキットで合成した ds cDNA、レーン M: λ *Hin*dIII digestion マーカー

期待される結果

1 μg の poly(A)$^+$ RNA からは 0.2~1 μg の ds cDNA が得られることが期待されます。

V. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) (3, 4)

本キットで使用しているシングルプライマー法[*1] による RACE ではアダプタープライマーあるいはアンカープライマーを使用しません。1 種類の遺伝子特異的プライマーのみでターゲット cDNA を増幅します(5)。そのメカニズム(図 2, p7)は、遺伝子特異的プライマーを含む 2 本鎖 DNA の末端が、λ ファージの付着端(*cos*)で観察されるように、PCR の伸長反応(68℃)の際に部分的に変性していること、および DNA 分子が環状になり易い傾向がある(6, 7, 8)ことに基づいています。鋳型 DNA 鎖の 5 ’末端まで合成を終えた熱安定性 DNA ポリメラーゼが、DNA が環状になりその触媒部位へ侵入した娘鎖の 5’端領域に、ある頻度[*2] で乗り換え(Template-switching)を起こして遺伝子特異的プライマーに相補的な塩基配列を 3’末端に持つ DNA(娘鎖)を合成します。これが鋳型になって 1 種類の遺伝子特異的プライマーのみでターゲット遺伝子の cDNA が効率的かつ正確に増幅されます。その結果、合成された cDNA は特徴的な構造—遺伝子特異的プライマーとその 3’フランキング配列数塩基～十数塩基(含まれない場合もあります)から成る末端逆方向繰返し配列(Terminal Inverted Repeat) (9, 10, 11, 12, 13)—を形成します(図 2 凡例)。

上で合成した ds cDNA を PCR の鋳型に用いることによって、5’ RACE および 3’ RACE の両方を行うことができます。

[*1] シングルプライマー法は日本国特許第 4,304,350 号、U.S. patent No. 7,504,240 によって保護されています。

[*2] 正確な頻度は現時点では解っていません。DNA のサイズにより異なると考えられます。また使用する熱安定性 DNA ポリメラーゼによっても異なる可能性が考えられます。

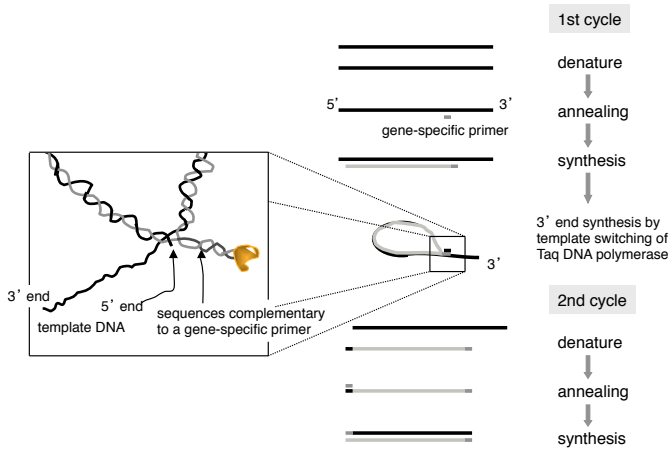


図 2. シングルプライマー法による RACE 反応のメカニズム(モデル)

鋳型 DNA の 5'末端に到達した熱安定性 DNA ポリメラーゼは娘鎖の 5'端領域の様々な位置に乗り換え(Template-switching)を起こすと推測されますが、十数回のシングルプライマーRACE 実験で得られた全ての cDNA クローンで、末端逆方向繰返し配列(Terminal Inverted Repeat)の長さは 24~34 bp の範囲内になりました(5 および未発表データ)。この結果は以下のように説明することが可能だと思われます。68℃で部分変性するのは ds cDNA の末端の約 40 bp 以内に限られることが主要な原因と考えられます。この部分変性の長さは DNA の GC 含有量にも左右されると推測されます。さらに、遺伝子特異的プライマー(24 mer を使用した)に相補的な配列を完全に持つ cDNA が PCR によって優先的に増幅されると考えられます。これらの要因によって、24~34 bp の末端逆方向繰返し配列(Terminal Inverted Repeat)を持つ cDNA が選択的に増幅されたと考えられます。

A. RACE PCR

RT-PCR を行うときのように比較的簡単な条件設定の下で RACE PCR を行うことができます。一般に、ホットスタート PCR、タッチダウン PCR あるいはステップダウン PCR のような複雑な条件設定をする必要はありません。
Tm 値は 60℃~65℃に設定してください。反応溶液の組成や Thermal Cycling の条件は、使用する熱安定性 DNA Polymerase の説明書に従って設定して下さい。サイクル数は RT-PCR より 5~10 回多く設定します。また、伸長反応の時間が長い方が Template-switching の機会が増大します(系統的な実証実験はまだ実施していない: 6 ページ [*2]を参照)。そこで、RT-PCR よりも 1 分から 2 分伸長反応の時間を長くして RACE PCR を行うことをお薦めします。

(例)

50 μl で PCR を行なう場合の反応用液の組成

滅菌水	29 μl
10X PCR Buffer	5 μl
Gene-specific (RACE) Primer (10 pmol/μl)	5 μl
2 mM dNTP	5 μl
ds cDNA	5 μl (1~2 ng)
熱安定性 DNA ポリメラーゼ(1 U/μl)	1 μl
Total volume	50 μl

Thermal Cycling は以下のように設定して下さい*。

（例）

94℃	2 min	
98℃	10 sec	┐
Tm(℃)	30 sec	35~40 cycles
68℃	4 min	┘

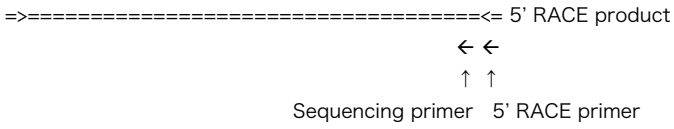
*使用する熱安定性 DNA ポリメラーゼに添付されている説明書の指示に従って PCR の条件設定を行って下さい。

反応液の一部(5~10 μl)と DNA サイズマーカーをアガロースゲル電気泳動に供して RACE 産物の有無を確認して下さい。

B. クローニングと DNA 塩基配列の決定

得られた RACE PCR 産物は TA クローニングベクターにクローニングした後、DNA の塩基配列を決定してターゲット cDNA が増幅されているかどうかを確認することをお薦めします。

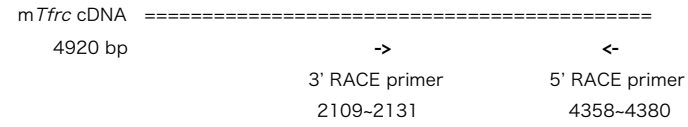
Direct DNA Sequencing によって RACE PCR 産物の確認を行う場合は、もう 1 種類の遺伝子特異的プライマーが必要になります。



C. コントロールm*Tfrc* 5'および3' RACEプライマーの用い方

数回の実験でRACE産物が検出できない場合には、m*Tfrc* 5' RACEプライマーあるいは3' RACEプライマーと作製したds cDNAサンプルを用いてRACE実験を行ってみるのが問題解決の一助になります。

まず両プライマーを用いてm*Tfrc*のRT-PCRを行い、産物が検出できるようにPCRの条件を整えます。次に、それぞれのプライマー単独でRACE PCRを行います。PCRの条件は、サイクル数と伸長反応の時間を除いては、RT-PCRと同様に設定します。サイクル数はRT-PCRより5~10回多く設定します。また上でも述べたように、伸長反応の時間が長い方がTemplate-switchingの機会が増加すると考えられます。まず1分長くしてRACE PCRを行ってみるのが良いと思われます。このコントロール実験でRACE PCRの条件設定の方法を把握できれば、様々なターゲット遺伝子に関してRACEを行うことが容易になると期待されます。



もしこのコントロール実験で望ましい結果が得られなかった場合は、精製したtotal RNAあるいはpoly(A)⁺ RNAもしくは合成したds cDNAに何らかの問題があると考えられます。アガロースゲル電気泳動によるチェック等を行なって問題の所在を確認し、total RNAあるいはpoly(A)⁺ RNAを再度精製し直す等の処置を行なって下さい(VI. A)。

注意：作製した ds cDNA がマウス由来でない場合は、各研究室で使用している生物種の *Tfrc*、*β-actin* 等のコントロールプライマーを用いて上記の実験を行って下さい。

D. コントロールプライマーによる RACE PCR と RT-PCR の実施例

本キットを用いて作製したマウス精巣 ds cDNA (図 1) (IV. 20.で 1/250 希釈したもの)とコントロール m*Tfrc* RACE プライマー(本キットに付属)を使用して 5' RACE PCR と RT-PCR を実施した例を示します。熱安定性 DNA ポリメラーゼは KOD -Plus- Neo (TOYOBO)を使用し、反応溶液の組成と Thermal Cycling の条件は以下のように設定しました。

・RACE PCR

滅菌水	26 μl
10X PCR Buffer	5 μl
Tfrc 5' RACE Primer (10 pmol/μl)	5 μl
2 mM dNTP	5 μl
25 mM $MgSO_4$	3 μl
ds cDNA	5 μl
KOD -Plus- Neo (1 U/μl)	1 μl
Total volume	50 μl

・RT-PCR

滅菌水	28 μl
10X PCR Buffer	5 μl
Tfrc 3' RACE Primer (10 pmol/μl) forward	1.5 μl
Tfrc 5' RACE Primer (10 pmol/μl) reverse	1.5 μl
2 mM dNTP	5 μl
25 mM $MgSO_4$	3 μl
ds cDNA	5 μl
KOD -Plus- Neo (1 U/μl)	1 μl
Total volume	50 μl

Thermal Cycling

94℃	2 min	
98℃	10 sec	┐
63℃	30 sec	├ 40 cycles
68℃	4 min	┘

RACE PCR サンプル 10μl および RT-PCR サンプル 2μl を 1%アガロースゲル電気泳動に使用しました(図 3)。

図 3(p10)に示したように~4.4 kb(全長), ~3 kb, ~2.4 kb 等の 5' RACE の産物(レーン 2~11)と~2.3 kb の RT-PCR の産物(レーン 1)が確認されました。5' RACE は 3 回の実験で得られた結果をまとめたものです。RACE 実験を行った反応チューブ(各 4 チューブずつ)の半分以上で産物が確認されました。産物が得られる割合はターゲット遺伝子によって変動すると考えられます。RACE 産物の量が RT-PCR に比べてかなり少ないのは、テンプレートになる一即ち最初の数サイクルの内に Template-switching が起こった一 cDNA の分子が 1～数分子に限られるためと考えられます。5' RACE の場合、複数のサイズの異なる cDNA 分子に Template-switching が起こった時には、複数のバンドが観察されることがあります。3' RACE の場合は、通常産物のサイズは一定になります。

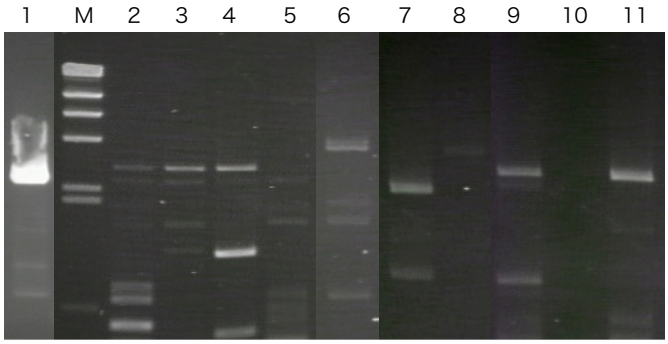


図 3. RACE PCR と RT-PCR の結果

レーン 1: RT-PCR、レーン M: λ *Hin*dIII digestion マーカー、レーン 2~11: 5' RACE PCR、レーン 2~5: 1 回の RACE 実験で得られた結果、レーン 6: cDNA を 1/10 希釈し伸長時間 8 分で得られた結果、レーン 7, 8: cDNA をそれぞれ 1/2 および 1/5 希釈し伸長時間 4 分で得られた結果、レーン 9: 上記の条件、レーン 10, 11: cDNA を 1/2 希釈し伸長時間 4 分で得られた結果、を示している。

通常 RACE 実験を行なう場合は、Tm でまず RACE PCR を行います。もし産物が全く見られない場合には、アニーリングの温度を 1~2℃下げて RACE PCR を行います。多くの非特異的産物と思われるバンドが見られる場合には、アニーリングの温度を 1~2℃上げて RACE PCR を行います。"非特異的産物が見られなくなりほぼ 1 種類の産物に限定されるようになったものが正規の RACE 産物である"という知見を基に実験を行えば成功の確率が高くなると期待されます。その際、cDNA を反応溶液に加えない等のネガティブコントロールの反応チューブを作っておくと結果の解析が行い易くなります。一般に、設計したプライマーに問題がなければ、Tm 付近で RACE 産物が得られると考えて良いと思われます。

E. RACE によってより長い cDNA を得たい場合

シングルプライマーRACE では長い cDNA を増幅することが可能ですが、一般に短い DNA 分子のほうがより環状化が起こり易いので、反応溶液内にターゲットとなる長い cDNA 分子と短い cDNA 分子が混在している場合には短い cDNA 分子の方がシングルプライマーRACE によって増幅され易くなります。

そこで、次の操作を行えばより長い cDNA を得ることが容易になります。合成した ds cDNA を DNA サイズマーカーと共にアガロースゲル電気泳動に供して分画する。高分子の cDNA を含むゲルを切り出して、エレクトロエリューション等(14, 15)や市販の DNA フラグメント抽出キットによって抽出する。抽出した cDNA を TE, pH8.0 で適切な濃度に希釈して、RACE PCR に使用する。

また、RACE PCR の最初の 2-3 サイクルでは伸長反応の時間を 8~10 分間と長くし、それ以降は通常の時間(4 分)に切り替えるとシングルプライマーRACE の長いテンプレートが得られる確率が増大します。また複数のバンドが観察される割合も増加します。図 3 のレーン 6 に示したように全てのサイクルを 8 分間の伸長反応で PCR を行なっても特に問題は生じませんでした。

VI. 問題の発生とその解決法

A. ds cDNA 合成

高品質な poly(A)$^+$ RNA が得られれば、通常 ds cDNA 合成も良い結果が得られます。精製した total RNA の一部をアガロースゲル電気泳動して rRNA (28S RNA および 18S RNA)や tRNA(+5S rRNA)の分解が起こっていないことを確認してから poly(A)$^+$ RNA の精製を行えば、高品質な poly(A)$^+$ RNA を得ることが可能になります。total RNA の約 1%が poly(A)$^+$ RNA として回収されます(14)。

また、精製した poly(A)$^+$ RNA の濃度を計測しておくことは重要です。必ずしも 1 μg の poly(A)$^+$ RNA を cDNA 合成に使用する必要はありませんが、その場合 TE, pH8.0 による ds cDNA の希釈率を変えることが必要になります。RACE 実験の精度を上げるために、可能な限り poly(A)$^+$ RNA の濃度を決定(簡易法でも良い(15A))してから cDNA 合成を行なうことをお薦めします。

B. RACE

数回の RACE PCR 実験を行った結果、非特異的産物が増幅される、RACE 産物が得られない等の問題が生じた場合は：

[1] 正規の産物ではないと思われるものが多く観察される場合には、使用する ds cDNA 量を 1/2, 1/5, 1/10 等に減らす。

[2] 産物がほとんど観察されない場合には、使用する ds cDNA 量を 2 倍、 3倍等にする。

[3] 状況に応じて使用する遺伝子特異的(RACE)プライマー量を変更する。（通常は使用量を減少する。）

以上のような工夫をして RACE PCR を行って下さい。RACE 産物が得られることがあります。

以上のような処置を施しても依然として非特異的産物が増幅される場合には、ホットスタート PCR、タッチダウン PCR 等の方法を使用することによって、RACE 実験の結果が改善される可能性があります。

C. 希少な転写産物の RACE

合成した ds cDNA 内に含まれているターゲット cDNA が非常に少ない場合には、使用する cDNA 量に関わらず RACE PCR の産物がアガロースゲル電気泳動で観察されないことがあります。そのようなときは、初回の RACE PCR サンプルの一部(5~10 μl)を用いて同じ条件で 2 回目の PCR を行うことによって産物が検出できる場合があります。

あるいは、"**V. E.** RACE によってより長い cDNA を得たい場合"と同様に、RACE PCR の最初の 2-3 サイクルで伸長反応の時間を 8~10 分間と長くして、それ以降は通常の時間(4 分)に切り替えると初期のサイクルでシングルプライマーRACE のテンプレートが合成される確率が増すと考えられます。

D. Genomic DNA の偶発的な増幅

シングルプライマー法による RACE は非常に感度が高いので cDNA 内にターゲットが存在しない場合には、poly(A)$^+$ RNA 精製時に混入したごく微量のゲノム DNA に存在するターゲット遺伝子を増幅することがあります。この問題は、poly(A)$^+$ RNA サンプルあるいは total RNA サンプルを RNase フリーの DNase で処理することによって解決されます。ゲノム DNA の増幅による混乱を避けたい場合は、poly(A)$^+$ RNA あるいは total RNA サンプルの DNase 処理をお薦めします。 RNase フリーの DNase で処理した poly(A)$^+$ RNA あるいは total RNA サンプルはフェノール抽出とエタノール沈殿を行って下さい。

もしくは、DNase 処理が可能な市販の RNA 精製用カラム等を使用して total RNA の精製を行うこともできます。

ターゲット遺伝子のエクソン・イントロン構造が既に判明している場合は、RACE プライマーをエクソンとエクソンの接合部を跨ぐように設計することによってこの問題は解決されます。

VII. シングルプライマーRACE 法の重要な特性と応用

[1] 5' RACE および 3' RACE が同じ cDNA を用いて行える。

[2] PCR の複雑な条件設定をする必要はない。RT-PCR のように比較的簡単な PCR の条件設定で効率的な RACE が行える。

[3] 長い cDNA が得られるのでスプライシングバリアントの探索等に適している。短いものはより高効率で得られる。

[4] 一旦 ds cDNA を合成すれば、λファージベクターへのクローニングをせずに、そのまま cDNA ライブラリーとして使用することができる。

[5] 1 種類の遺伝子特異的プライマーのみで RACE PCR による cDNA ライブラリーのスクリーニングができる。

[6] *in vitro* DNA 組換え法を用いることによって、5'および 3' RACE 産物から容易に全長 cDNA が得られる。

[7] T4 DNA ポリメラーゼによる ds cDNA 末端の平滑化処理およびアダプターあるいはアンカーのライゲーションが cDNA ライブラリーの作製に必要ないー即ち cDNA ライブラリーのサイズが T4 DNA ポリメラーゼ処理およびライゲーションの効率に左右されないーので、希少な mRNA (16, 17)に由来する cDNA も効率的に単離することができる(18, 19)。

[8] 本 RACE キットを使用することによって、Expressed Sequence Tag (EST) (20)や Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) (21)あるいは Differential Display (22)による解析で得られた短い RNA 配列の情報を基にして全長 cDNA を単離し、より詳細にその特性の解析を行なうことができる。

[9] microRNA (pri-miRNA) (23)や lncRNA (24, 25)等も、本キットで作製した cDNA およびシングルプライマーRACE 法を用いて単離し、その特性を解析することができる。上記[8]で検出される可能性が考えられる。

[10] 種々の生物のゲノム DNA の増幅にもシングルプライマー法を応用することができる。とりわけ、挿入変異誘発(insertional mutagenesis)に使用した DNA エレメントをゲノム DNA からレスキューして挿入変異が起こった遺伝子を特定する方法として非常に有用である。また、トランスジェニック生物(細胞)の作製に使用したベクターDNA が挿入されているゲノム DNA の部位を容易に決定することができる。

VIII. Conclusion 推断

以上のように、シングルプライマー法を使用した本キット accura-expRACE KIT を用いて様々な反応条件下で多数のプライマーを用いて RACE 実験を行なうことによって、存在している cDNA はほぼ全てが増幅されてクローニング可能になることが期待されます。

IX. 参考文献

1. Okayama, H. & Berg, P. (1982) High-efficiency cloning of full-length cDNA. Mol. Cell. Biol. 2, 161-170.
2. Gubler, U. & Hoffman, B.J.(1983) A simple and very effective method for generating cDNA libraries. Gene 25, 263-269.
3. Frohman, M.A., Dush, M.K. & Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002.
4. Chenchik, A., Diachenko, L., Moqadam, F., Tarabykin, V., Lukyanov, S. & Siebert, P.D. (1996) Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. BioTechniques 21, 526-534.
5. Hirano, M. (2004) RACE using only a gene-specific primer: application of a template-switching model. Mol. Biotechnol. 27, 179-186.
6. Levene, S.D. & Crothers, D.M. (1986) Ring closure probabilities for DNA fragments by Monte Carlo simulation. J. Mol. Biol. 189, 61-72.
7. Cloutier, T.E. & Widom, J. (2004) Spontaneous sharp bending of double-stranded DNA. Molec. Cell 14, 355-362.
8. Du, Q., Smith, C., Shiffeldrim, N., Vologodskaia, M. & Vologodskii, A. (2005) Cyclization of short DNA fragments and bending fluctuations of the double helix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 5397-5402.
9. Panganiban, A. T. & Temin, H. M. (1983) The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for integration but not virus production. Nature 306, 155–160.
10. Wang, K. & Pearson, G. D. (1985) Adenovirus sequences required for replication in vivo. Nucleic Acids Res. 13, 5173–5187.
11. Olasz, F., Farkas, T., Kiss, J., Arini, A., & Arber, W. (1997) Terminal inverted repeats of insertion sequence IS30 serve as targets for transposition. J. Bacteriol. 179, 7551–7558.
12. Calvi, B. R., Hong, T. J., Findley, S. D., & Gelbart, W. M. (1991) Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: hobo, Activator, and Tam3. Cell 66, 465–471.
13. Morgan, G. T. (1995) Identification in the human genome of mobile elements spread by DNA-mediated transposition. J. Mol. Biol. 254, 1–5.
14. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J. A. & Struhl, K. (Eds) (1994) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
15. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
16. Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D.A., Duttagupta, R., Willingham, A.T., Stadler, P.F., Hertel, J., Hackermüller, J., Hofacker, I.L., Bell, I, Cheung, E., Drenkow, J., Dumais, E., Patel, S., Helt, G., Ganesh, M., Ghosh, S., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Tammana, H. & Gingeras, T.R. (2007) RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. Science 316, 1484-1488.
17. Mercer, T.R., Gerhardt, D.J., Dinger, M.E., Crawford, J., Trapnell, C., Jeddeloh, J.A., Mattick, J.S. & Rinn, J.L. (2012) Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. Nature Biotechnol. 30, 99–104.
18. Hirano, M. & Noda, T., (2004) Genomic organization of the mouse Msh4 gene producing bicistronic, chimeric and antisense mRNA. Gene 342, 165-177.
19. Hirano, M. (2008) Natural Grp78 antisense RNA induces apoptosis by creating a chimeric mRNA with Msh4 pre-mRNA. In A. G. Hernandes, (Ed), Antisense Elements (Genetics) Research Focus, (pp 27-69), Nova Science Publishers, Inc., New York.
20. Sikela, J.M. & Auffray, C. (1993) Finding new genes faster than ever. Nature Genet. 3, 189-191.
21. Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., & Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. Science 270, 484-487.
22. Liang, P. & Pardee, A. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257, 967-970.
23. Yates, L.A., Norbury, C.J. & Gilbert, R.J.C. (2013) Long and short of microRNA. Cell 153, 516-519.
24. Numata, K., Kanai, A., Saito, R., Kondo, S., Adachi, J., Wilming, L.G., Hume, D.A., Hayashizaki, Y. & Tomita, M. (2003) Identification of putative noncoding RNAs among the RIKEN mouse full-length cDNA collection. Genome Res. 13, 1301-1306.
25. Nam, J-.W. & Bartel, D.P. (2012) Long noncoding RNAs in C. elegans. Genome Res. 22, 2529-2540.

注) 本キットを使用後、中箱はチューブスタンドとして使用できます。

accra-expRACE KIT に関するご意見、ご質問等は Email: contact@elplain.com までご連絡ください。
テクニカルサポート　Email: tech@elplain.com
エルプレイン研究所の承認を得ずに製品の再販、再販のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。本印刷物に記載されている会社名あるいは商品名等は、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは所有者に帰属します。
シングルプライマー法は日本国特許第 4,304,350 号、U.S. patent No. 7,504,240 によって保護されています。

株式会社エルプレイン研究所
〒111-0033
東京都台東区花川戸 1-12-2
TEL: 03-6231-6605
Email: contact@elplain.com